

(19)



European Patent Office

Office européen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer:

**0 135 071**  
**A3**

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 84108906.3

(51) Int. Cl.<sup>3</sup>: **G 01 N 33/533**  
**G 01 N 33/543**

(22) Anmeldetag: 27.07.84

(30) Priorität: 29.07.83 DE 3327327

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
27.03.85 Patentblatt 85/13

(68) Veröffentlichungstag des später  
veröffentlichten Recherchenberichts: 03.02.88

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

(71) Anmelder: Henning Berlin GmbH Chemie und  
Pharmawerk  
Kornstrasse 19-20  
D-1000 Berlin 42(DE)

(72) Erfinder: Gadow, André  
Lettberger Strasse 43  
D-1000 Berlin 47(DE)

(72) Erfinder: Wood, W. Graham, Ph.D.  
Am Waldrand 29  
D-2401 Gross-Grönuau(DE)

(74) Vertreter: Werner, Hans-Karsten, Dr. et al,  
Deichmannhaus am Hauptbahnhof  
D-5000 Köln 1(DE)

(54) Lumineszenz Immunoassay für Haptene und hierfür verwendbares chemilumineszent-markiertes Haptenkonjugat sowie Verfahren zur Herstellung derselben.

(57) Lumineszenz Immunoassays für Haptene lassen sich dadurch verbessern und empfindlicher machen, daß man ein lumineszent-markiertes Haptenkonjugat verwendet, welches als Verknüpfungsgruppe ein kettenförmiges Polymeres mit wiederkehrenden funktionellen Gruppen enthält, an welches pro Mol sowohl mehrere Mole zur Lumineszenz befähigte Gruppen, als auch mehrere Mole Hapten gebunden sind. Als Antikörper wird vorzugsweise ein solcher verwendet, der gewonnen wird durch Verwendung eines anderen kettenförmigen Polymers, an welches das Hapten durch eine andere chemische Reaktion gebunden ist.

EP 0 135 071 A3

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19)



European Patent Office  
Office européen des brevets

(11)

Veröffentlichungsnummer:

0 135 071  
A2

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21)

Anmeldenummer: 84108906.3

(51)

Int. Cl.<sup>4</sup>: G 01 N 33/533  
G 01 N 33/543

(22)

Anmeldetag: 27.07.84

(30)

Priorität: 29.07.83 DE 3327327

(43)

Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
27.03.85 Patentblatt 85/13

(84)

Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

(71)

Anmelder: Henning Berlin GmbH Chemie und  
Pharmawerk  
Kornstrasse 19-20  
D-1000 Berlin 42(DE)

(72)

Erfinder: Gadow, André  
Lettberger Strasse 43  
D-1000 Berlin 47(DE)

(72)

Erfinder: Wood, W. Graham, Ph.D.  
Am Waldrand 29  
D-2401 Gross-Grönau(DE)

(74)

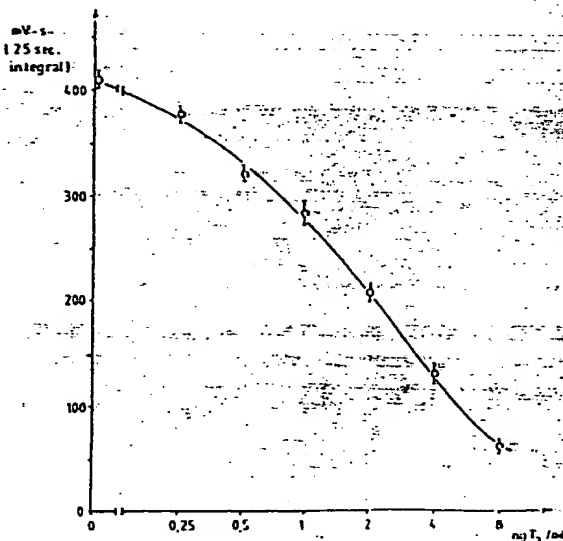
Vertreter: Werner, Hans-Karsten, Dr. et al.  
Deichmannhaus am Hauptbahnhof  
D-5000 Köln 1(DE)

(54)

Lumineszenz Immunoassay für Haptene und hierfür verwendbares chemilumineszent-markiertes Haptenkonjugat sowie Verfahren zur Herstellung derselben.

(57)

Lumineszenz Immunoassays für Haptene lassen sich dadurch verbessern und empfindlicher machen, daß man ein lumineszent-markiertes Haptenkonjugat verwendet, welches als Verknüpfungsgruppe ein kettenförmiges Polymeres mit wiederkehrenden funktionellen Gruppen enthält, an welches pro Mol sowohl mehrere Mole zur Lumineszenz befähigte Gruppen, als auch mehrere Mole Hapten gebunden sind. Als Antikörper wird vorzugsweise ein solcher verwendet, der gewonnen wird durch Verwendung eines anderen kettenförmigen Polymers, an welches das Hapten durch eine andere chemische Reaktion gebunden ist.



Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Lumineszenz Immunoassay für Haptene, die hierin enthaltenen chemilumineszent-markierten Haptenkonjugate sowie Verfahren zu deren Herstellung.

Lumineszenz Immunoassays für Haptene bestehend aus

5 A) einem für das jeweilige Hapten spezifischen Antikörper und B) einem chemilumineszent-markierten Haptenkonjugat. Dieses Haptenkonjugat enthält im allgemeinen eine zur Chemilumineszenz befähigte Gruppe, eine Verknüpfungsgruppe und ein  
10 Hapten. Die Verknüpfungsgruppe kann im einfachsten Fall ersetzt werden durch eine direkte chemische Bindung, jedoch ist es üblich, durch eine Verknüpfungsgruppe einen gewissen räumlichen Abstand zu erzielen. Die Verknüpfungsgruppe wird deshalb  
15 auch meist "Spacer" genannt. Es hat sich gezeigt, daß bei einer direkten Kopplung von Haptenen mit einer zur Chemilumineszenz befähigten Gruppe die Eigenschaften beider Gruppen so verändert wurden, daß die Empfindlichkeit und Spezifität der Tests  
20 verringert wurden. Zum einen veränderten sich die chemilumineszenten Eigenschaften und zum anderen die Spezifität des Haptens zu seinem Antikörper.

Typische chemilumineszent-markierte Konjugate und  
25 diese enthaltende Lumineszenz Immunoassays sind beispielsweise aus der DE-OS 29 21 781 bekannt. Die Verknüpfungsgruppe R (dort auch Brückengruppe genannt) soll demnach maximal 1 bis 50, vorzugsweise 1 bis 10 Kohlenstoffatome oder Heteroatome  
30 aufweisen, so daß das Molekulargewicht dieser Gruppe 1000 nicht übersteigt und vorzugsweise weniger als 200 beträgt; vgl. S. 34 und 35. Die dort beschriebenen Lumineszenz Immunoassays weisen zwar gegenüber Radioimmunoassays den Vorteil auf, daß  
35 man nicht mit radioaktiven Substanzen arbeiten muß, die nur eine begrenzte Lebensdauer haben und

wegen der entsprechenden Schutzvorschriften begrenzt eingesetzt werden können, dafür erreichen sie aber bei weitem nicht die von Radioimmunoassays bekannte Empfindlichkeit bzw. Reproduzierbarkeit.

5

Aus der DE-OS 29 13 549 sind chemisch induzierte Fluoreszenz-Immunteste bekannt, bei welchen der Antiligand spezifisch am epitopen Zentrum des Liganden gebunden wird und als Marker ein lichtemittierendes reziprokes Paar vorgesehen ist, welches aus einer Chemilumineszenzquelle und einem Quencher besteht, der das von der Chemilumineszenzquelle emittierte Licht kollisionsfrei auslöschen kann. Dabei werden Konjugate mit Chemilumineszenzmarkierung und Konjugate mit Quenchermarkierung gebildet und an Bestandteile des immunologischen Paares gebunden. Das darin beschriebene Prinzip beruht auf der Feststellung, daß bei Vorhandensein eines Farbstoffes innerhalb eines begrenzten Abstands von einer chemilumineszierenden Verbindung oder Gruppe im erregten Zustand, die chemilumineszierende Verbindung oder Gruppe ihre Energie auf den Quencher stoßfrei und ohne Strahlungsemission übertragen kann. Der Quencher kann sodann die Strahlung bei einer höheren Wellenlänge als die chemilumineszierende Verbindung oder Gruppe emittieren und kann die Energie durch strahlungslosen Zerfall verlieren. Dabei ist es prinzipiell möglich an höher molekulare Liganden sowohl mehrere Mole-chemilumineszierende Substanz oder Quencher zu koppeln. In der Beschreibung wird erwähnt, daß es prinzipiell möglich sei, auch eine Mehrzahl von Markern an den Bestandteil des immunologischen Paares zu binden, wobei sogenannte polyligandenanaloge Marker ent-

10

15

20

25

30

35

05 stehen. Besondere Vorteile derartiger Systeme sind  
jedoch nicht erwähnt. Ein Nachteil besteht darin,  
daß das analoge Paar den Quencher in vergleich-  
baren Abständen enthalten muß, um entsprechend  
wirksam zu sein. Bei den relativ kleinen Haptenen  
ist die Besonderheit zu beachten, daß diese oft-  
mals zu einer wesentlich verringerten Chemilumi-  
neszenz führen, ohne daß zusätzlich ein ausdrück-  
licher Quencher an den Rezeptor gebunden ist. Die-  
se Wechselwirkung zwischen Hapten und chemilumi-  
neszierender Gruppe ist bereits mehrfach beobach-  
tet worden und führt zu verringerter Empfindlich-  
keit und Spezifität der Teste, weshalb man in sol-  
chen Fällen vorzugsweise mit einem "Spacer" arbei-  
tet.

10 Die vorliegende Erfindung hat sich die Aufgabe  
gestellt, Lumineszenz Immunoassays für Haptene zu  
verbessern und sie bezüglich der Handhabung, der  
Empfindlichkeit und der Reproduzierbarkeit den  
Radioimmunoassays vergleichbarer zu machen. Dabei  
soll gleichzeitig angestrebt werden, die einzelnen  
Bestandteile dieses Immunoassays einfach, reprodu-  
zierbar und im größeren Maßstab herstellbar zu  
machen. Diese Aufgabe wurde überraschenderweise  
dadurch gelöst, daß man ein chemilumineszent-mar-  
kiertes Haptenkonjugat verwendet, welches zwischen  
der zur Chemilumineszenz befähigten Gruppe und dem  
Hapten eine Verknüpfungsgruppe aufweist, die ein  
kettenförmiges Polymeres mit wiederkehrenden funk-  
tionellen Gruppen ist, an welches pro Mol sowohl  
mehrere Mole zur Lumineszenz befähigte Gruppen als  
auch mehrere Mole Hapten gebunden sind.

35 Dieses Ergebnis war nicht vorhersehbar, da nach  
dem Stand der Technik die Verknüpfungsgruppe so

05 klein wie möglich gehalten werden sollte und stets  
nur eine zur Chemilumineszenz befähigte Gruppe mit  
einem Hapten verbunden werden sollte. Überraschen-  
derweise hat sich gezeigt, daß die Empfindlichkeit  
und Reproduzierbarkeit eines Chemilumineszenz Im-  
munoassays für Haptene erheblich gesteigert werden  
kann, wenn man stattdessen mehrere Mole der zur  
Chemilumineszenz befähigten Gruppe mit mehreren  
10 Molen des Haptens in der Weise miteinander ver-  
knüpft, daß sie mit ausreichendem Abstand an ein  
kettenförmiges Polymeres gebunden sind.

15 Für den erfindungsgemäßen Lumineszenz Immunoassay  
wird als weitere Komponente ein für das Hapten  
spezifischer Antikörper verwendet, der vorzugswei-  
se gewonnen wird durch Verwendung eines anderen  
kettenförmigen Polymeren an welchem durch eine  
andere chemische Reaktion mehrere Mole Hapten ge-  
bunden sind. Die so erhaltenen Antikörper sind  
20 hochspezifisch bezüglich des Haptens in freier  
Form als auch in gebundener Form an ein ketten-  
förmiges Polymeres. Diese Antikörper weisen hingen-  
gen keine spezifische Bindungsfähigkeit auf für  
andere kettenförmige Polymere, an die mit einer  
25 anderen chemischen Reaktion Gruppen angekoppelt  
wurden.

30 { Als kettenförmige Polymere mit wiederkehrenden  
funktionellen Gruppen können insbesondere Peptide,  
Glykoproteine, Glykolipide oder Kohlenhydrate ein-  
gesetzt werden. Typische Beispiele für derartige  
Polymere sind Polysaccharide wie Dextrane, Pec-  
tine, Lectine und natürliche Gummen, Peptide wie  
p-Lys, p-Lys-Glu, p-Lys-Tyr, p-Glu-Tyr, Proteine  
35 wie Serum-Albumine und Globuline, Glykoproteine  
wie Transferrin, Thyreoglobulin, Orosomucoid usw.

05 Die Polymeren müssen eine ausreichende Anzahl wiederkehrender funktioneller reaktiver Gruppen aufweisen, wie Amino-, Carboxyl-, Carbonyl-, Thionyl-, Hydroxyl-, und/oder zur Diazokupplung befähigte Gruppen, an die mit Hilfe üblicher und bekannter Methoden sowohl zur Chemilumineszenz befähigten Gruppen als auch die Haptene an das Polymere gekoppelt werden können.

10 Derartige Kopplungsreagenzien sind beispielsweise für die direkte Kopplung Glutardialdehyd, Bromcyan, Hydrazine, Bisepoxirane, Divinylsulfone, Epichlorhydrin, Benzochinone, Perjodat, Trichloro-s-Triazine, Isothiocyanate, Arylamine und Phenylhydrazine. Die dabei entstehenden Bindungstypen sind beispielsweise Michael Addukte und Schiff'sche Basen, Cyanat-Ester, Triazinyle, Ether, Imidocarbonate, Amide, gemischte Anhydride, Alkylamine, Ester. Für die indirekte Kopplung kommen Reagenzien in Frage wie EEDQ (N - Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin) Carbodiimide wie Dicyclohexylcarbodiimid, 1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinyl-(4)-ethyl) carbodiimid-methyl-p-toluol-sulfonat, 1-Ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl) carbodiimid hydrochlorid und N - Hydroxysuccinimide. Weiterhin kommen heterobifunktionelle Reagenzien in Frage wie MBS (m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester) und andere.

30 Als zur Chemilumineszenz befähigte Gruppen kommen prinzipiell alle hierfür bekannten Substanzen in Frage wie sie beispielsweise in der DE-OS 29 21 781 ausführlich zusammengestellt sind. Weiterhin kommen in Frage, gewisse Acridiniumester, 35 Oxalatester sowie das in der DE-OS 31 32 491 be-

schriebene Fluoresceinisothiocyanat.

05 Als Haptene kommen alle analytisch interessanten  
organischen Substanzen in Frage, die eine immuno-  
chemische Reaktion in einem Gasttier entwickeln,  
wenn sie in Form eines immunogenen Konjugats aus  
dem Hapten und einem Trägermolekül injiziert wer-  
den. Typische Haptene und die Gewinnung von hier-  
10 gegen spezifischen Antikörpern sind in der DE-OS  
29 21 781, Seiten 45 bis 53 beschrieben.

In der Praxis bewährt hat sich als zur Chemilumi-  
neszenz befähigte Gruppe Luminol, welches in dia-  
15 zotierter Form als Diazoluminol an ein Polymeres  
gebunden werden kann, welches zur Diazokupplung  
geeignete Gruppen aufweist. Die Haptene werden  
vorzugsweise über eine Carbodiimid-Reaktion an das  
Polymere gebunden. Als Polymeres hat sich bei-  
20 spielsweise das Glykoprotein Transferrin ausge-  
zeichnet bewährt.

Der Antikörper gegen das jeweilige Hapten wird  
vorzugsweise dadurch gewonnen, daß man dieses Hap-  
25 ten mit einem anderen Carbodiimid an ein anderes  
Polymere, beispielsweise Serum-Albumine koppelt  
und hiermit das zur Antikörperherstellung ausge-  
wählte Tier behandelt.

30 Es hat sich gezeigt, daß derartige Antikörper  
hochspezifisch sind sowohl für das reine Hapten  
als auch für das erfindungsgemäße chemilumines-  
zent-markierte Haptenkonjugat. Unspezifische  
Effekte und Kreuzreaktionen werden hingegen hier-  
35 bei vermieden.  
Die Menge der zur Chemilumineszenz befähigten

Gruppen sowie die Menge des Haptens, die an das in der Verknüpfungsgruppe verwendete Polymere gebunden ist, sollten im allgemeinen mindestens 10 sein, so daß sich ein Molverhältnis Verknüpfungsgruppe zu zur Lumineszenz befähigten Gruppe zu Hapten von mindestens 1:10:10 ergibt.

Der für das Hapten spezifische Antikörper wird für den erfindungsgemäßen Lumineszenz Immunoassay vorzugsweise an einen festen Träger gebunden. Intensive Voruntersuchungen der Anmelderin haben zu dem Ergebnis geführt, daß als feste Träger Polystyrolkugeln besonders geeignet sind, die mit einem synthetischen Polypeptid wie p-Phe-Lys und Glutardialdehyd aktiviert wurden. Prinzipiell sind aber auch andere feste Träger geeignet, sofern der Antikörper hieran ohne nennenswerte Beeinträchtigung seiner spezifischen Reaktivität reproduzierbar und gleichmäßig gebunden werden kann.

Die Messung der Chemilumineszenz von Luminol und Luminol-Derivaten kann an derartigen Kugeln in sehr einfacher Weise in einer Meßküvette erfolgen zu der in alkalischem Milieu Wasserstoffperoxid und Peroxidase zugegeben werden. Die dabei auftretende Lichtreaktion kann in bekannten Geräten, beispielsweise dem Luminometer LKB 1251 der Firma LKB, gemessen werden. Es hat sich gezeigt, daß die Handhabung, Empfindlichkeit und Präzision derartiger Lumineszenz Immunoassays für Haptene völlig vergleichbar ist mit der von entsprechenden Radioimmunoassays. Diese erfindungsgemäßen Lumineszenz Immunoassays sind obendrein für die Automation geeignet und können daher auch in Vollautomaten verwendet werden.

In den nachfolgenden Beispielen werden erfindungs-  
gemäße chemilumineszent-markierte Haptenkonjugate  
sowie mit deren Hilfe hergestellte Lumineszenz  
Immunoassays für Haptene ausführlicher beschrie-  
ben, wobei die speziell gewählten zur Chemilumi-  
neszenz befähigten Gruppen, Verknüpfungsgruppen  
und Haptene keine Beschränkung der Erfindung be-  
deuten sollen.

### B e i s p i e l 1

#### I. Herstellung eines chemilumineszent-markierten Haptenkonjugats z.B. ((Triiodothyronine (T<sub>3</sub>))-Transferrin-(Diazoluminol)

a) Herstellung eines Transferrin-T<sub>3</sub>-Konjugats mit-  
tels Carbodiimid-Kopplung:

44 mg Transferrin (human, Behring-Werke MW 88 000)  
(0,5 µmol) werden in 2 ml bidestilliertem Wasser  
gelöst. Nach rascher Zugabe von 42,9 mg (100 µmol)  
MCDI (1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinyl-(4)-ethyl)-  
carbodiimide-methyl-p-toluol-sulfonat) (Merck  
MW 429) gelöst in 500 µl bidestilliertem Wasser  
wird unter Rühren durch tropfenweise Zugabe von  
0,01 N Salzsäure ein pH-Wert von 6 eingestellt.  
17 mg Triiodothyronine (T<sub>3</sub>) (MW 673, Sigma) werden  
in 1 ml bidestilliertem Wasser suspendiert und  
durch tropfenweise Zugabe von 0,5 mol/l NaOH bis  
zur vollständigen Lösung gerührt. Diese Lösung  
wird tropfenweise unter Rühren zu der obigen Lö-  
sung gegeben, wobei durch Zugabe von 0,05 normaler  
Salzsäure der pH-Wert auf 6 gehalten wird. Man  
läßt anschließend 2 Stunden bei Raumtemperatur und  
24 Stunden bei 3°C weiter reagieren. Die Lösung

wird zentrifugiert. Das Transferrin- $T_3$ -Konjugat im Überstand wird durch Gelfiltration über Sephadex G-25 (Pharmacia) oder Ultrogel A 6 (LKB) getrennt. Als Elutionspuffer wird 10 mM/l Phosphat pH 7-8 mit 0.15 mol/l Natriumchlorid verwendet. Die einzelnen Fraktionen werden photometrisch auf Proteingehalt sowie auf  $T_3$ -Immunoreaktivität getestet. Die Fraktionen, welche sowohl proteinhaltig als auch  $T_3$ -immunreaktiv sind, werden vereinigt. Aus den Meßwerten ergibt sich, daß das Substitutionsverhältnis  $T_3$  : Transferrin 14 mol/mol beträgt. Das Konjugat kann im gefrorenen Zustand gelagert oder lyophilisiert werden.

b) Kupplung von Diazoluminol an das Transferrin- $T_3$

Konjugat

I. Diazotierung von Luminol:

0,2 mmol Luminol (25,44 mg) (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazindion, Ega-Chemie) werden in 5 ml 1 mol/l Salzsäure suspendiert und im Eisbad unter gleichmäßigem Rühren auf 0°C gekühlt. 1,5 mmol Kaliumnitrit (128 mg) werden in 1 ml Wasser gelöst und im Eisbad auf 0°C gekühlt. Die kalte Kaliumnitritlösung wird nun tropfenweise der Luminol-Suspension zugegeben, bis die gelbgrüne Trübung verschwunden ist und sich eine klare gelbe bis gelborange Lösung ausbildet. Überschüssige salpetrige Säure wird durch Zugabe einer Harnstofflösung entfernt. Die so erhaltene Diazoluminol-Lösung kann direkt verwendet werden. Sie ist im gefrorenen Zustand ca. eine Woche stabil.

Diazokupplung des Diazoluminols an das Transferrin-T<sub>3</sub>-Konjugat:

20 mg lyophilisiertes Transferrin-T<sub>3</sub>-Konjugat werden in 3 ml Wasser gelöst. Durch 0,1 mol/l Natriumcarbonat-Lösung wird der pH-Wert auf 9-9,5 eingestellt. Die Diazoluminol-Lösung wird tropfenweise bei 0°C unter Rühren zugegeben, und zwar bis zu einem Verhältnis von 100 mol Diazoluminol pro Mol Transferrin-T<sub>3</sub>-Konjugat. Hierbei wird mit weiterer Natriumcarbonat-Lösung der pH-Wert bei 9 gehalten. Das End-Reaktionsgemisch wird 24 Stunden bei 3°C gelagert. Das so erhaltene Transferrin-T<sub>3</sub>-Diazoluminol-Konjugat wird in gleicher Weise wie das Transferrin-T<sub>3</sub>-Konjugat durch Gelfiltration gereinigt. Die einzelnen Fraktionen werden getestet 1. mit einem Photometer bei 280 nm, 2. auf T<sub>3</sub>-Immunoreaktivität, 3. auf Diazoluminol-Lumineszenz-Reaktion im LKB 1251 und 4. spezifische Bindung an T<sub>3</sub>-Antikörper, sowie unspezifische Bindungseigenschaften.

Die Fraktionen mit meßbarem Proteingehalt, mit spezifischer Bindung an T<sub>3</sub>-Antikörper jedoch ohne nennenswerte unspezifische Bindungseigenschaften werden vereinigt. Die Meßwerte ergeben ein Substitutionsverhältnis von Transferrin:T<sub>3</sub>:Diazoluminol von 1:14:20. Das so erhaltene Konjugat kann sowohl lyophilisiert als auch im gefrorenen Zustand gelagert werden.

II. Verwendung des chemilumineszent-markierten Haptenkonjugats in einem Lumineszenz-Immunoassay für Haptene (Transferrin-T<sub>3</sub>-Diazoluminol in einem T<sub>3</sub>-Chemilumineszenzassay)

5

a) Immobilisierung von Antikörpern auf einem festen Träger (T<sub>3</sub> Antikörper auf Polystyrolkugeln)

10

Mit einem synthetischen Polypeptid (p-Phe-Lys, MW 30 000) beschichtete Polystyrolkugeln von 6,4 mm werden mit einer 0,5%-igen wäßrigen Lösung von Pentan-1,5-dial aktiviert. Die so erhaltenen Kugeln werden bei pH 7,5-8,5 in 0.05 mol/l Phosphatpuffer mit einem gereinigten T<sub>3</sub> Antikörper versetzt. Der T<sub>3</sub> Antikörper wurde gewonnen in Kaninchen mittels T<sub>3</sub>-Rinderserumalbumin-Konjugat als Immunogen, das erhalten wurde unter Verwendung von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDAC). Die gebildeten Schiff'schen Basen wurden

15

20

25

30

in einigen Fällen vorsorglich mit Natriumborhydrid reduziert, jedoch zeigte sich kein wesentlicher Unterschied in der Stabilität. Die verbliebenen aktiven Gruppen wurden mit Rinderserumalbumin abgesättigt. Die Absättigung war meist erst nach mehreren Tagen vollständig, was durch Messung der unspezifischen Bindung kontrolliert wurde. Die mehrfach gewaschenen Kugeln wurden im Luftstrom getrocknet oder in 0,05 molarem Tris/Salzsäure-Puffer unter Zusatz von Rinderserumalbumin aufbewahrt. Getrocknete Kugeln wurden zur Rekonstitution vor dem Gebrauch eine Stunde in den gleichen Puffer gegeben.

35

b) Messungen der Chemilumineszenz

Als Oxidationssystem diente ein Gemisch aus Microperoxidase (Microperoxidase MP11-Sigma) 5  $\mu\text{mol/l}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,5%) und 0,8 mol/l NaOH. Als Puffer wurde ein 0,05 molarer Phosphatpuffer vom pH 7 unter Zusatz von 0,1 mol Natriumchlorid verwendet sowie 4g/l Rinderserumalbumin und 0,015 mol/l  $\text{NaN}_3$ . Die Microperoxidase und der Puffer wurden kurz vor der Messung gemischt. Der pH-Wert der Endreaktionslösung betrug 13. Hierdurch erfolgt eine Verlangsamung der Chemilumineszenz-Kinetik, die Präzision wird jedoch gesteigert. Gemessen wurde nach dem Start der Reaktion durch  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zugabe, wobei die Lichtemission über eine Periode von 20 bis 30 Sekunden als Integral gemessen wird.

c) Durchführung des  $\text{T}_3$ -Lumineszenz-Immunoassays

Jeweils 100  $\mu\text{l}$  Serumprobe bzw. Standard wurden mit 200  $\mu\text{l}$  Inkubationspuffer (0,1 mol/l Tris-HCl von pH 7,4, 0,02 mol/l KCl, 0,2% Rinderserumalbumin) sowie 75 mg/100 ml ANS (8-Anilino-1-naphthalinsulfonsäure) mit den mit Antikörpern beschichteten Polystyrolkugeln 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 50  $\mu\text{l}$  einer 1:100 Verdünnung des  $\text{T}_3$ -Transferrin-Diazoluminolkonjugats zugesetzt, kurz aufgeschüttelt und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde zweimal mit Inkubationspuffer und einmal mit 0,9%-iger Natriumchloridlösung gewaschen. Die Kugeln werden in die Meßküvetten überführt und wie oben beschrieben die Chemilumineszenz gemessen.

Typische Meßwerte sind in der Tabelle 1 (Figur 1) zusammengestellt. Die untere Nachweisgrenze liegt somit etwa bei 0,25 ng T<sub>3</sub>/ml.

Tabelle 1

5

10

15

20

25

30

35

| T <sub>3</sub> /Lumineszenzassay |            |     |                 | T <sub>3</sub> /RIA |       |          |
|----------------------------------|------------|-----|-----------------|---------------------|-------|----------|
| Chemilumineszenz                 |            |     |                 |                     |       |          |
| (Integrationszeit=20sec.)        |            |     |                 |                     |       |          |
| ng T3/ml                         | mV - s     | MW  | B/BO x 100 in % | IPM (a)             | MW    | B/BO (%) |
|                                  |            |     |                 | (b)                 |       |          |
| 0                                | 415<br>429 | 422 | 100             | 15686<br>15151      | 15418 | 100      |
| 0,25                             | 378<br>398 | 388 | 92              | 13937<br>13605      | 13771 | 89,3     |
| 0,50                             | 324<br>331 | 327 | 78              | 12012<br>12195      | 12103 | 78,5     |
| 1                                | 280<br>270 | 275 | 65              | 9828<br>9876        | 9852  | 63,9     |
| 2                                | 199<br>210 | 204 | 48              | 7168<br>7194        | 7181  | 46,6     |
| 4                                | 132<br>112 | 122 | 29              | 4981<br>5127        | 5054  | 32,8     |
| 8                                | 66<br>52   | 59  | 14              | 2915<br>2967        | 2941  | 19,1     |

In der nachfolgenden Tabelle 2 sind erfindungsge-  
mäß ermittelte Meßwerte, im Vergleich zu denen  
eines Radioimmunoassays, zusammengestellt.

5

Tabelle 2

10

Korrelation zwischen Meßwerten nach dem Chemi-  
lumineszenzassay und einem Radioimmunoassay unter  
Verwendung von drei Kontrollseren für T<sub>3</sub>.

15

|           | T <sub>3</sub> /RIA<br>ng/ml | T <sub>3</sub> /Lumineszenzassay<br>ng/ml |
|-----------|------------------------------|---|
| Serum I   | 0,34 ± 0,2                   | 0,31 ± 0,1 *)                             |
| Serum II  | 1,2 ± 0,4                    | 0,97 ± 0,4                                |
| Serum III | 3,4 ± 1                      | 2,97 ± 1,2                                |

20

\*) Mittelwert ± dreifache Standardabweichung.  
(Anzahl der jeweils gemessenen Proben n = 20)

25

Beispiel 2

30

35

In analoger Weise wie in Beispiel 1 beschrieben  
wurde ein Proteinkonjugat wie folgt hergestellt:  
385 mg Schweine-Thyreoglobulin mit ca. 80 µm Ly-  
sinresten wurde mit 1155 mg Bernsteinsäureanhydrid  
(11,6 mmol) umgesetzt. Dazu wurde das Thyreoglobu-  
lin unter Rühren in 25 ml Wasser gelöst und der  
pH-Wert mit einer 1 n NaOH auf 7 eingestellt. Das  
Bernsteinsäureanhydrid wurde in kleinen Portionen  
zugegeben und dabei der pH-Wert mit Hilfe von 1 n  
NaOH im Bereich von 7 bis 8 gehalten. Nach einer

Stunde Rühren bei Raumtemperatur wurde der pH-Wert mit 1 n Salzsäure auf ca. 2,5 eingestellt, wobei sich ein dicker Niederschlag von ca. 80 ml bildete. Diese Suspension wurde in eine Amicon-Zelle überführt, auf 30 ml eingeeengt und mehrmals mit 50 ml Wasser aufgeschlämmt und erneut eingeeengt. Nach 6 Waschvorgängen war der pH-Wert 5. Der Inhalt der Zelle wurde portioniert, eingefroren und lyophyliert.

150 mg dieses Produktes wurden in 30 ml Wasser gelöst und unter gleichzeitiger Zugabe von 80 mg MCDI mit 38 mg L-T<sub>4</sub>-Ethylester in 2 ml Methanol versetzt. Der pH-Wert wurde mit 1 n Salzsäure auf 4 eingestellt. Nach 30 Minuten wurde nochmals 80 mg MCDI zugegeben. Nach weiteren 20 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde die Suspension in einen Dialyseschlauch überführt und 3 Tage lang dialysiert, wobei 2 mal täglich das Wasser gewechselt wurde. Der Dialyseschlauch wurde entleert und die Suspension zentrifugiert. Das klare Zentrifugat wurde in Portionen von 4 bis 5 ml unterteilt, eingefroren und lyophilisiert. Der Niederschlag wurde in Ammoniak oder Ammoniumacetat gelöst, danach ebenfalls portioniert, eingefroren und gefriergetrocknet. Die weitere Aufarbeitung und Kupplung mit Diazoluminol erfolgte in analoger Weise wie in Beispiel 1 beschrieben, wobei ein T<sub>4</sub>-Lumineszenz-Immunoessay entstand.

1.) Lumineszenz Immunoassay für Haptene bestehend aus

A) einem für das jeweilige Hapten spezifischen Antikörper

und

B) einem chemilumineszent markiertem Haptenkonjugat, enthaltend

a) eine zur Chemilumineszenz befähigte Gruppe,

b) eine Verknüpfungsgruppe und

c) ein Hapten, dadurch gekennzeichnet, daß die Verknüpfungsgruppe b) ein kettenförmiges Polymeres mit wiederkehrenden funktionellen Gruppen ist, an welches pro Mol sowohl mehrere Mole zur Lumineszenz befähigte Gruppen als auch mehrere Mole Hapten gebunden sind.

2.) Lumineszenz Immunoassay gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der in A) benutzte spezifische Antikörper unter Verwendung eines Haptens als Immunogen gewonnen wurde, welches an eine andere Verknüpfungsgruppe gebunden ist als die gemäß b) verwendete.

3.) Lumineszenz Immunoassay gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Verknüpfungsgruppe b) ein Peptid, ein Glykoprotein, ein Glykolipid oder ein Kohlenhydrat ist.

4.) Lumineszenz Immunoassay gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Molverhältnis der Verknüpfungsgruppe b) zu der chemilumineszenz befähigten Gruppe a) zum Hapten c) mindestens 1:10:10 beträgt.

05 5.) Lumineszenz Immunoassay gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der für das jeweilige Hapten spezifische Antikörper A) auf einem festen Träger gebunden vorliegt.

6.) Chemilumineszent-markiertes Haptenkonjugat, enthaltend

- 10 a) eine zur Chemilumineszenz befähigte Gruppe,  
b) eine Verknüpfungsgruppe und  
c) ein Hapten, dadurch gekennzeichnet, daß die Verknüpfungsgruppe b) ein kettenförmiges Polymeres mit wiederkehrenden funktionellen Gruppen ist, an welches pro Mol sowohl mehrere  
15 Mole zur Lumineszenz befähigte Gruppen als auch mehrere Mole Hapten gebunden sind.

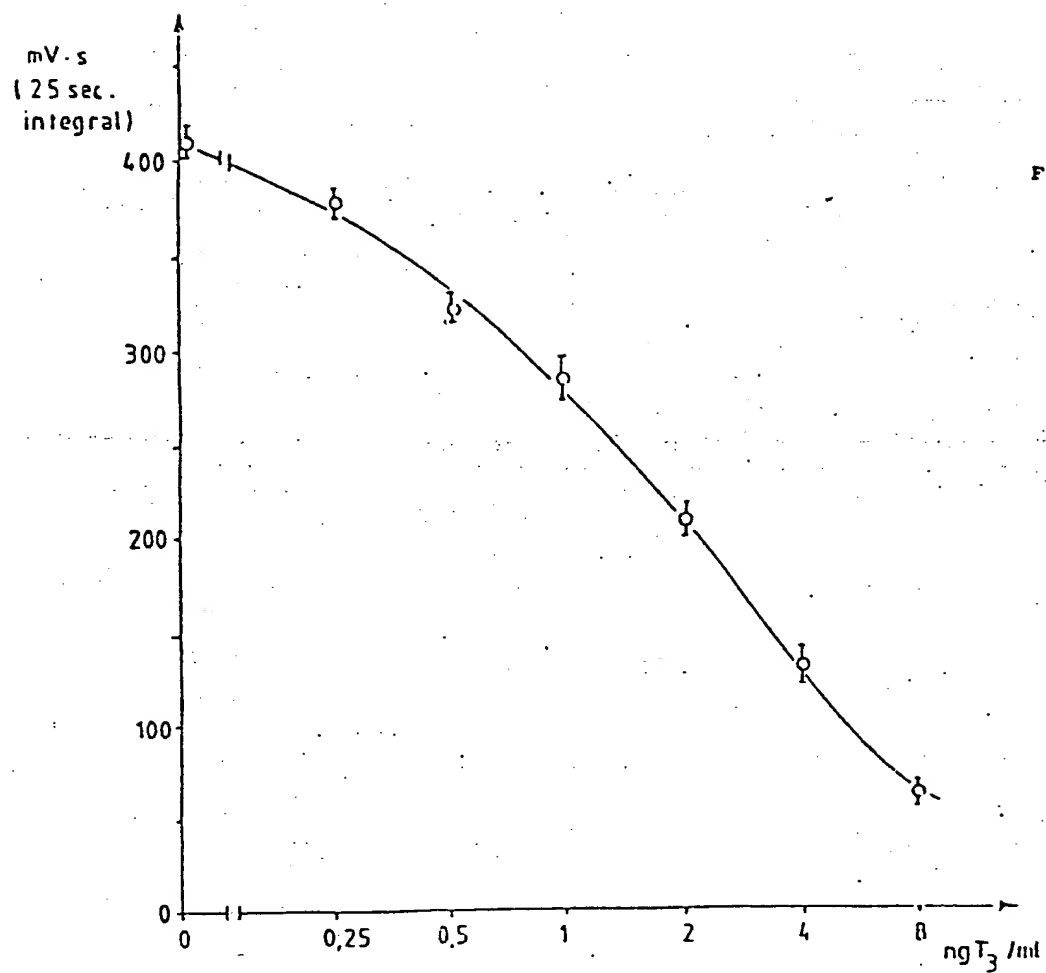
20 7.) Markiertes Haptenkonjugat gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Verknüpfungsgruppe

b) ein Peptid, ein Glykoprotein, ein Glykolipid oder ein Kohlenhydrat ist.

25 8.) Markiertes Haptenkonjugat gemäß Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Molverhältnis der Verknüpfungsgruppe b) zu der zur Lumineszenz befähigten Gruppe a) zum Hapten c) mindestens 1:10:10 beträgt.

30 9.) Verfahren zur Herstellung eines lumineszent-markierten Haptenkonjugats, enthaltend a) eine zur Chemilumineszenz befähigte Gruppe,  
b) eine Verknüpfungsgruppe und  
35 c) ein Hapten, dadurch gekennzeichnet, daß man ein kettenförmiges Polymeres mit wiederkehren-

den funktionellen Gruppen b) gleichzeitig oder nacheinander in beliebiger Reihenfolge sowohl mit mehreren Molen zur Lumineszenz befähigter Gruppen a) als auch mit mehreren Molen Hapten  
05 c) chemisch verbindet.





Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

0135071

Nummer der Anmeldung

EP 84 10 8906

## EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE

| Kategorie  | Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile          | Betrifft Anspruch                          | KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.4)         |
|--|--|--|--|
| X  | EP-A-0 047 459 (INTERNATIONAL DIAGNOSTIC TECHNOLOGY)<br>* Insgesamt *                        | 1-3,5-9                                    | G 01 N 33/533<br>G 01 N 33/543//<br>G 01 N 33/78 |
| Y  | EP-A-0 003 583 (LEE SIN HANG)<br>* Claims 1-14 *   | 1-3,5-9                                    |  |
| X  | US-A-4 169 137 (HIRSCHFELD)<br>* Insgesamt *   | 1,2  |  |
| Y  |  | 3,5-9                                      |  |
| A  | US-A-4 275 160 (P. SINGH)<br>* Zusammenfassung; Spalten 1-4 *                                | 1-3,5-9                                    |  |
| P,Y  | EP-A-0 087 564 (MILES LABORATORIES)<br>* Zusammenfassung; Seite 12, Zeile 25 -<br>Seite 17 * | 1-3,5-9                                    |  |
| A  | US-A-4 261 893 (BOGUSLASKI)<br>* Insgesamt *   | 1-3,5-9                                    |  |
|  |  |  | RECHERCHIERTE<br>SACHGEBIETE (Int. Cl.4)         |
|  |  |  | G 01 N   |
| Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.   |  |  |  |
| Recherchenort<br>DEN HAAG  |  | Abschließdatum der Recherche<br>03-11-1987 | Prüfer<br>OSBORNE H.H.                           |
| KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE  |  |  |  |
| X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet<br>Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer<br>anderen Veröffentlichung derselben Kategorie<br>A : technologischer Hintergrund<br>O : mündliche Offenbarung<br>P : Zwischenliteratur  |  |  |  |
| T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze<br>E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder<br>nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist<br>D : in der Anmeldung angeführtes Dokument<br>L : aus andern Gründen angeführtes Dokument<br>& : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes<br>Dokument |  |  |  |

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**